〔食品検査用試薬〕

***2013年11月作成（第4版）
**2011年8月作成（第3版）

MycoJudge トータルアフラトキシン≪取扱説明書≫

※本キットをご使用になる前に必ずお読みください。

【開発の経緯】

アフラトキシンは、*Aspergillus flavus*などのカビが生産する発がん性物質で、動物や人に対して強い肝毒性などを有します。アフラトキシンは13種類に分類され、その中で最も毒性が強いのは、アフラトキシンB_1と考えられています。このアフラトキシンによる食品の汚染は、ピーナッツをはじめとするナッツ類、豆類、トウモロコシなどの穀類、および香辛料などで報告されています。

本品は、酵素免疫測定法（ELISA法：Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)による食品中のトータルアフラトキシン量（B_1、B_2、G_1、G_2の総量）簡易測定用キットであり、平成23年8月16日付け食安監発0816第7号医薬食品局食品安全部監視安全課長通知「トウモロコシ中の総アフラトキシンの試験法について」別添に示されている「総アフラトキシン簡易測定装置の基準」を満たしていることが確認されています。**

【本品の特徴】

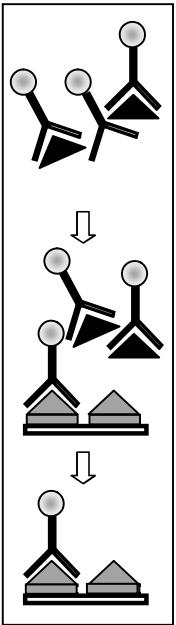
1） 食品中のトータルアフラトキシン（B_1, B_2, G_1, G_2）を高感度（2.5ppb以上）に測定可能です。

【キットの内容】

A：抗原固相化プレート（カバー付き）･･････････････････････････････････････96 ウェル（8 ウェル×12 列）×1 枚
B：混合用プレート･･96 ウェル×1 枚
C：0ppb標準溶液（メタノール　70%含有）･･･1mL×1 本
D：1.25ppb標準溶液（メタノール　70%含有）（注1）･･････････････････････････････････････1mL×1 本
E：2.5ppb標準溶液（メタノール　70%含有）（注1）･･･････････････････････････････････････1mL×1 本
F：5.0ppb標準溶液（メタノール　70%含有）（注1）･･･････････････････････････････････････1mL×1 本
G：10ppb標準溶液（メタノール　70%含有）（注1）･･1mL×1 本
H：20ppb標準溶液（メタノール　70%含有）（注1）･･1mL×1 本
I：HRP 標識抗体（100 倍濃縮）･･･200μL×1 本
J：抗体希釈液（メタノール　22%含有）･･･20mL×1 本
K：発色液（TMB）･･15mL×1 本
L：反応停止液（0.5N 硫酸）･･･15mL×1 本
M：濃縮洗浄液（10 倍濃縮）･･100mL×1 本
N：取扱説明書･･1 部

注1） 標準溶液にはアフラトキシンが含まれています。取り扱いには十分気をつけてください。

【測定原理】

① 混合用プレート上で、測定溶液および標準溶液中のアフラトキシンとHRP標識抗体を反応させます。
② あらかじめ抗原（アフラトキシン-BSA複合体）を固相化した抗原固相化プレートに①の混合溶液を添加すると、未反応の抗体がプレート上の抗原と結合します。
③ 洗浄操作により抗原固相化プレートに結合していない抗体（試料抽出液および標準溶液中のアフラトキシンと結合した抗体）を除去した後、発色基質を加えて酵素反応させます。
④ プレート上の抗原と結合した抗体のHRPにより触媒される発色を測定し、定量します。

【性能】

1）測定範囲と検出限界

本キットの測定範囲は2.5~20ppb、検出限界は1.25ppbであることが、競合法ELISAの精度プロファイルにより確認されています。

2）再現性試験

アフラトキシンを5または10ppb添加したトウモロコシ検体を、5名の測定者が各々5回分析した結果、RSD15%以内を示しました。

3）反応性試験

各アフラトキシンを10ppb添加したトウモロコシ検体を30回分析した結果、各アフラトキシンへの反応性はB_1 100%, B_2 34%, G_1 51%, G_2 15%を示しました。

【使用上または取り扱い上の注意事項】

〔一般的な注意事項〕

1） この取扱説明書をよく読み、記載された操作方法に従って使用してください。
2） 使用期限の過ぎたキットおよび構成品は使用しないでください。使用期限は外箱および各構成品ラベルに記載されています。
3） 本キットの測定に使用する機械・器具類の使用方法等については、それぞれの製造元もしくは販売元にご確認ください。
4） 各検査手順や各々の食品におけるアプリケーションの妥当性については自ら検証してください。
5） 商品の仕様については、予告なく変更になる場合があります。

〔危険防止上の注意事項〕

1） 本キットの試薬類が、皮膚、粘膜、衣類等に付着しないよう注意してください。
2） 誤って試薬が目や口に入った場合には、直ちに水道水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、医師の手当てを受けてください。
3） 本キットでは、測定時に、メタノール、アフラトキシン、および0.5N硫酸などの試薬を使用します。取り扱いの際には十分注意してください。詳細については本キットのMSDSをご確認ください。

〔廃棄上の注意事項〕

1） 本キット、試料ならびに測定溶液等を廃棄する場合には、当該地域の条例に従って廃棄する、もしくは都道府県知事の許可を受けた産業廃棄物処理業者に委託してください。
2） 測定に用いた器具、検体等は、破棄又は洗浄する前に、0.5～1.0%の次亜塩素酸ナトリウム溶液に2時間以上浸漬してください。**

【保存方法・使用期限】

1） 保存方法：冷蔵（2～8℃）、遮光にて保存してください（凍結厳禁）。
2） 使用期限：製造日より12ヶ月。外箱および各構成品ラベルに記載されています。***

【参考文献】

1．食安発第0331第6号「アフラトキシンを含有する食品の取扱いについて」**
2．食安監発第0816号第7号「トウモロコシ中の総アフラトキシンの試験法について」**
3．岩木和夫, 林譲：日薬理誌（*Foia Pharmacol. Jpn.*）134, p207-211（2009）

〔販売元および問い合わせ先〕

キット外装ラベルに記載

〔製造元〕
〒300-2646　茨城県つくば市緑ヶ原3-3
日本ハム株式会社　中央研究所
電話：029(847)7825／FAX：029(848)1256
URL：http://www.rdc.nipponham.co.jp

【必要な機器】

〔試薬の調製〕

- メスシリンダー、ビーカー、マイクロピペット等

〔測定溶液の調製〕

- 粉砕機（フードカッター）、秤、キャップ付プラスチック製容器（遠心分離可能なもの）、振とう機、遠心分離機（3,000 x g 以上、室温で遠心分離可能なものを推奨）、ろ紙、漏斗等

〔測定操作およびデータ解析〕

- マイクロピペット、試験管もしくはマイクロチューブ、吸収紙（ペーパータオル）、マイクロプレートリーダー（波長 450nm および 600～650nm のフィルターがセットされたもの）、解析ソフト（4 係数 Logistic 解析が可能なもの）等

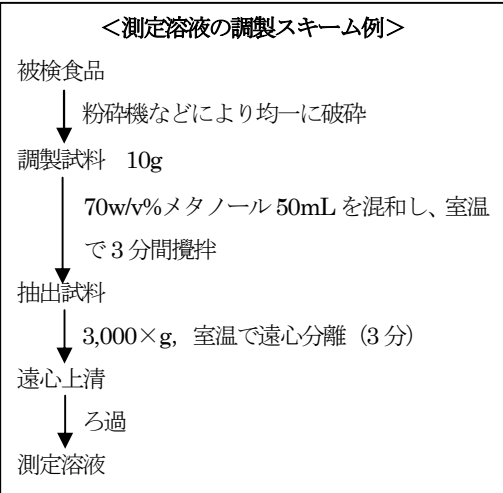
【測定溶液の調製（一般的な食品における操作例）】

1） 被検食品（検体）を粉砕機などにより均一な状態に粉砕したものを調製試料とします（注１）。

2） 調製試料 10g を密閉容器に量りとり、70w/v%メタノール 50mL を加え 3 分間ボルテックスミキサーなどを用いてよく攪拌し、固形分を均等に分散します（注２）。

3） 3,000×g，室温で 3 分間遠心分離、もしくは室温で 30 分間静置して分離された上清をろ過し、ろ液を測定溶液とします。

注1） 器具類を介したコンタミネーションを防止するため、よく洗浄した器具もしくはディスポーザブルの器具を使用してください。特に粉砕機やホモジナイザーについては検体ごとに確実に洗浄してください。

注2） 試料の量は必要に応じて増やしてください。この時、メタノールは試料の 5 倍量を加えてください。

【試薬の調製】

〔そのまま使用する試薬〕

- 標準溶液：室温（20～25℃）に戻して使用してください。
- 抗体希釈液：室温（20～25℃）に戻して使用してください。
- 発色液：必要量を遮光容器に分注し、室温（20～25℃）に戻して使用してください。
- 反応停止液：室温（20～25℃）に戻して使用してください。

〔調製して使用する試薬〕

- HRP 標識抗体：あらかじめ室温に戻した抗体希釈液を用いて 100 倍希釈し、15 分以内に使用してください（注１）。
- 濃縮洗浄液：精製水にて 10 倍希釈して使用してください。

注1） HRP 標識抗体は使用直前まで冷蔵保存し、使用後は直ちに冷蔵保存してください。

注2） ロット番号の異なる試薬を混合、もしくは差し替えて使用しないでください。

注3） 分注、希釈などのピペット操作は測定精度に大きく影響するため正確に行ってください。また、分注、希釈ごとにマイクロピペットのチップを交換してください。

【測定操作】

1） プレ反応

① あらかじめ室温に戻した混合用プレートの各ウェルに希釈調製した HRP 標識抗体溶液を 150μL ずつ加えてください（注１）。

② 各濃度の標準溶液および測定溶液を 30μL ずつ加え、マイクロプレート振とう機などを用いて軽く攪拌してください。

③ 軽く攪拌した後、室温（20～25℃）で、5 分間静置して反応させてください（注２）。

2）反応

① 抗原固相化プレートをアルミパウチ袋に入れたまま室温に戻し、使用直前にアルミパウチ袋から必要な数のストリップを取り出してください（注３）（注４）。

② 抗原固相化プレートの各ウェルに１）で調製したプレ反応液を 100μL ずつ加え、マイクロプレート振とう機などを用いて軽く攪拌してください。

③ 攪拌後、室温（20～25℃）で、10 分間静置して反応させてください。反応終了後、ウェル内の反応液を捨て、各ウェルに洗浄液 250μL を加え、これを捨てる操作を 3 回繰り返してください（注５）。

2） 発色

① 各ウェルにあらかじめ室温に戻した発色液を 100μL ずつ加え、マイクロプレート振とう機などを用いて軽く攪拌してください。

② 攪拌後、室温（20～25℃）で、3 分間静置して発色させてください。

3） 反応停止

① 各ウェルにあらかじめ室温に戻した反応停止液を 100μL ずつ加え、マイクロプレート振とう機などを用いて軽く攪拌して発色を停止してください。

4） 吸光度測定

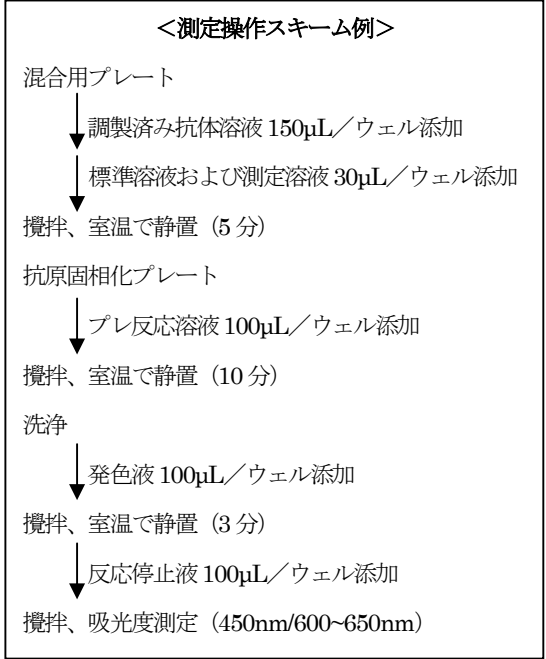
① プレートリーダーにて主波長 450nm、副波長 600～650nm の吸光度を測定してください。

注1） 標準溶液および測定溶液の測定には各3ウェルずつ使用することを推奨します。また標準溶液による検量線は測定毎に必ず作成してください。

注2） 紫外線によるアフラトキシンの変性を防ぐため、反応時には直射日光を避けてください。アルミホイル等でカバーすることを推奨します。

注3） 1回の測定に使用するプレートは最大6ストリップ（プレート半分）までにしてください。各ウェル間の反応時間に誤差が生じるため、正確に定量できない可能性があります。

注4） 使用しないストリップを必ず乾燥剤入りのアルミパウチ袋に戻し、冷蔵保存してください。

注5） 正確な測定を行うために洗浄操作は非常に重要です。プレートを逆さにしてペーパータオルなどの上で数回強く叩きつけるなどの水切りを行い、ウェルに残った液と気泡を完全に除去した後、速やかに次の試薬を加えてください。

【データ解析】

1） 標準溶液を測定して得られた吸光度から、4 係数 Logistic 解析（4－パラメーター解析）を用いて検量線グラフを作成します（注１）。

2） 作成した標準曲線から、試料中のトータルアフラトキシン濃度（ppb）を読み取ります。

注1） 添付の標準溶液濃度は、試料の抽出操作時の希釈係数 5を考慮し濃度設定されています。したがって、検量線から直接、抽出前試料中のアフラトキシン濃度を読み取ることができます。

注2） 解析方法の違いにより、測定結果が若干異なる場合があります。

注3） 測定濃度が 20ppb を超える検体については、1.25-20ppb の範囲で測定できるように希釈により測定溶液を再調製し、測定してください。解析の際、測定濃度に希釈倍数を乗じてください。

注4） 測定結果はアフラトキシン B_1, B_2, G_1, G_2 の総量を表します。